

過酸化物によるミオグロビンの酸化反応の解析

著者	遊佐 敬介
号	1031
発行年	1987
URL	http://hdl.handle.net/10097/24882

氏名・（本籍）	ゆ さ けい すけ 遊 佐 敬 介
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理博第 1031 号
学位授与年月日	昭 和 62 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）生物学専攻
学 位 論 文 題 目	過酸化物によるミオグロビンの酸化反応の解析
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 小 西 和 彦 教 授 竹 内 拓 司 助 教 授 四 釜 慶 治

論 文 目 次

第一章 緒 論

第二章 過酸化水素による MbO₂ の酸化反応

第一節 序 論

第二節 材料および方法

第三節 結 果

第四節 考 察

第五節 要 約

第三章 過酸化水素による deoxyMb の酸化反応

第一節 序 論

第二節 材料および方法

第三節 結 果

第四節 考 察

第五節 要 約

第四章 総合考察

引用文献

図 表

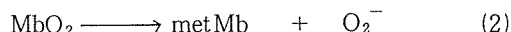
論文内容要旨

第1章 緒論

ミオグロビン (Mb) は分子量約 17,000 のヘムタンパク質で、心筋や骨格筋などの赤筋中に含まれ、酸素の貯蔵体として或いは酸素の拡散促進体として重要な役割を果たしている。ところでミオグロビンが、酸素分子を可逆的に結合してオキシミオグロビン (MbO_2) となることが出来るのは、そのヘム鉄が二価の状態にある場合である。



しかし、この MbO_2 は容易に自動酸化され、 O_2^- の生成を伴ってヘム鉄が三価の状態のメトミオグロビン (metMb) となり、その酸素結合能力を失ってしまう。



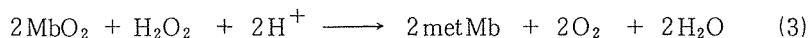
MbO_2 は結合酸素によって自動酸化されるばかりではなく、種々の薬物によっても酸化されるが、in vivo において重要な意味をもつものは、過酸化物による酸化反応である。というのは、筋肉組織中には過酸化水素を直接・間接生成する代謝系が数多く存在するからである。グルコース酸化酵素などのフラビンを含む酵素からは H_2O_2 が直接生成する他、筋肉中にぎっしり詰まったミトコンドリアの電子伝達系からは O_2^- の不均化反応由来の H_2O_2 の生成が知られている。また、その他の過酸化物として不飽和脂肪酸由来の過酸化脂質が考えられる。

本研究では、過酸化物のなかでもっとも単純な型 ($\text{H}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$) であり、かつ重要と思われる過酸化水素を取りあげる。まず、オキシミオグロビンに種々の濃度の過酸化水素を加え、その酸化当量や酸化速度、反応の pH 依存性等を詳細に検討した。その結果、過酸化水素は Mb の oxy-型と反応するよりも deoxy-型と反応する可能性が示唆されたので、次に deoxyMb と過酸化水素との反応性について検討し、反応機構を明らかにした。

第2章 過酸化水素による MbO_2 の酸化反応

第一節 序論

オキシミオグロビン (MbO_2) と H_2O_2 との反応に関しては次の反応式が提唱されているが、その詳細な反応機構については未だ明らかではない。



ここでは MbO_2 に対し当量以下の H_2O_2 を加えてその反応過程を追跡した。

第二節 材料と方法

実験には oxy- 型の純度95%以上のマッコウジラ MbO_2 標品を用いた。

第三節 結果

(1) 反応過程の二相性

MbO_2 の自動酸化 (式 (2)) は一次反応であり、その反応速度定数は pH 7.0, 25°C では $k_A = 7.88 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ である。この MbO_2 の自動酸化反応系に、当量以下の種々の濃度の H_2O_2

を加えると、MbO₂ はさらに容易に酸化されて metMb となる。H₂O₂ 添加直後に MbO₂ は急激に酸化されるが、その速度は徐々に減少し、やがて一定の値となる二相性を示した。反応開始直後の急速な MbO₂ の酸化過程では、加えた H₂O₂ の量と共にその速度は増大し、また酸化される MbO₂ の量も増加した。しかしそれに続く過程では、その反応速度は加えた H₂O₂ 量に依存せず、H₂O₂ を全く加えない時の自動酸化反応そのものの速度に等しくなった。このことは、H₂O₂ による MbO₂ の酸化は反応の初期過程ですでに完了しており、それ以後は自動酸化反応のみが起きていることを意味している。

(2) 反応の化学量論

加えた H₂O₂ による MbO₂ の酸化反応は、その反応の初期過程ですみやかに完了する。従って後期反応過程の一次プロットを時間 $t = 0$ へ外挿して得られる切片は、初期反応過程で H₂O₂ により酸化された MbO₂ 量に対応する。後期反応過程からの外挿直線は、次式で与えられる。

$$-\ln ([\text{MbO}_2]_t / [\text{MbO}_2]_0) = k_A t - \ln (1 - f_\phi) \quad (4)$$

但し f_ϕ は加えた H₂O₂ によって酸化される MbO₂ の fraction である。

この外挿直線の切片 $-\ln (1 - f_\phi)$ から H₂O₂ によって酸化される MbO₂ の量を求めた。その結果、pH 5.5 ~ 10.2 の全領域において、1 モルの H₂O₂ により 2 モルの MbO₂ が酸化されるものと結論された。

(3) 初期反応過程の解析

H₂O₂ による MbO₂ の酸化反応は、MbO₂ に関していずれの pH でも一次であった。そこでこの反応速度定数を k_ϕ^{obs} とすると、初期過程の反応は、つぎのように書ける。

$$[\text{MbO}_2]_t = [\text{MbO}_2]_0 \exp(-k_\phi^{\text{obs}} \cdot t) \quad (5)$$

そして k_ϕ^{obs} は k'_ϕ を比例定数とすると次式で表されることがわかった。

$$k_\phi^{\text{obs}} = k_A + k'_\phi [\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad (6)$$

ここで k_A は MbO₂ 本来の自動酸化反応の速度定数で、 $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 0$ の時の縦軸切片に相当する。このようにして求められる k'_ϕ は、加えた H₂O₂ 1 モル当りの MbO₂ の酸化速度定数に相当する。

(4) k'_ϕ の pH 依存性

pH 5.5 ~ 10.2 の広い pH 領域にわたって k'_ϕ を測定した結果、 k'_ϕ は反応の pH には依存せず一定の値として求まった。

$$k'_\phi = 7.5 (\pm 2.0) \times 10^4 \text{ h}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

従って反応速度に H⁺ が直接関与することはないと結論された。

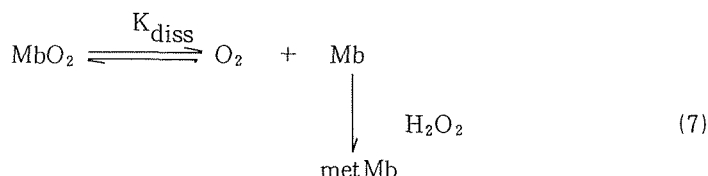
第四節 考 察

metMb を多量に含む純度の低い MbO₂ 標品をもちいた場合には、加えた H₂O₂ の実効濃度が低下する現象がみられた。これは加えた H₂O₂ の一部が metMb によって消費されたためと考えられる。

第3章 過酸化水素による deoxy Mb の酸化反応

第一節 序 論

H_2O_2 による MbO_2 の酸化反応が、次式(式(7))に示すように、共存するごく少量の deoxy - 型を酸化することによって進行しているのかどうかを明らかにする目的で、 H_2O_2 と deoxyMb との反応を直接調べた。



次に、反応生成物について検討した。 H_2O_2 は鉄二価の deoxyMb を一電子酸化して直接、鉄三価の metMb とするのか、それとも最終的には metMb となるものの二電子酸化して、いったんは鉄四価の ferrylMb にまで酸化するのか、このいずれであるのかを同定し、あわせて全体の反応機構を考察する。

第二節 材料と方法

deoxyMb は $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ をもちいて反応混液中の酸素を除去することによって調整した。

第三節 結 果

(1) deoxyMb と H_2O_2 の反応

実効濃度 $25\ \mu\text{M}$ 相当の H_2O_2 を加えた時の、酸化反応の半減期 $t_{1/2}(\text{deoxy})$ を求め、これを oxyMb のものと比較した。その結果、deoxy- 型の Mb は、oxy- 型の Mb と比べて、200 倍以上も酸化されやすいことが分かった。

このように MbO_2 の H_2O_2 による酸化反応が、すべて deoxyMb を通して進行するものと考えると、 k'_ϕ は deoxyMb と H_2O_2 との反応速度定数 k_ϕ を用いて次式で書ける。

$$k'_\phi = k_\phi \frac{K_{\text{diss}}}{[\text{O}_2]} \quad (8)$$

ここで $K_{\text{diss}} = 8.85 \times 10^{-7} \sim 1.45 \times 10^{-6} \text{M}$, $k'_\phi = 20.8 \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$, $[\text{O}_2] = 2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ で

あるから、 k_ϕ は

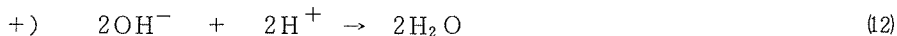
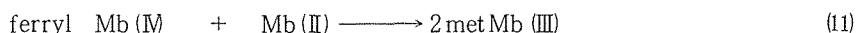
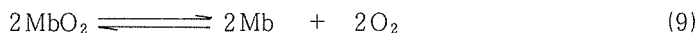
$$k_\phi = 3.6 \times 10^3 \sim 5.9 \times 10^3 \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

と計算される。

(2) 反応生成物の検討

25°C において deoxyMb に当量の H_2O_2 を作用させた場合は metMb が生成し、それ以外の反応生成物は確認できない。ところが、反応温度を 2°C に下げて deoxyMb に当量の H_2O_2 を作用させると、ferrylMb に特徴的なスペクトルが現れる。この事実から H_2O_2 は deoxyMb に作用して二電子酸化を行ない、まず鉄四価の ferryl-Mb を形成するものと結論される。しかし、この ferryl Mb も直ちに deoxyMb と反応して最終的にはすべて metMb となった。

以上から MbO₂ と H₂O₂ の反応は次のように書ける。そして、この反応式は先に求めた化学量論関係も満たすことがわかった。



第四節

H₂O₂ は deoxyMb のヘムポケット内に侵入し、空席になっている第六配位座に配位して、ヘム鉄から直接二電子を奪うものと考えられる。ところが oxy- 型では酸素分子がヘム鉄の第六配位座を占めていることで H₂O₂ の接近を妨げ、ヘム鉄を酸化から守っており、いわば protector としてふるまっているものと考えられる。

第四章 総合考察

deoxyMb は oxyMb に比べて H₂O₂ によって 200 倍以上も酸化されやすいことが明らかとなった。従って筋肉組織内においても、酸素の供給が十分でなく deoxy- 型を多く含む場合には、ミオグロ빈は過酸化物によってより容易に酸化され、その酸素結合能を失ってしまうであろう。筋肉末梢組織への十分な酸素の供給は細胞の好氣的代謝の維持に重要であるばかりでなく、酸素貯蔵体としてのミオグロ빈分子自身の酸化をも同時に保護していることになる。

生体内では過酸化脂質もミオグロ빈を酸化する強力な物質であるが、過酸化水素と違って長い炭素骨格を持っているので、ヘム鉄に直接配位してミオグロ빈を酸化するには steric な制限が生じるものと考えられ、過酸化水素とは異なる反応機構で進行する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

遊佐敬介提出の論文は、ヘム蛋白質であるミオグロビン（Mb）が過酸化物によって酸化される反応を速度論的に解析し、その分子論的作用機構を明らかにすることを目的としたものである。

ミオグロビンは脊椎動物の心筋や骨格筋などの赤筋中において、酸素分子の貯蔵体として重要な役割を果たしているが、この過程でMbが O_2 を可逆的に結合できるのは、そのヘム鉄の原子価が2価の状態のときである。ところで、このオキシミオグロビン（MbO₂）は、過酸化水素や過酸化脂質などによって容易に酸化されて、ヘム鉄の原子価が3価の状態のメトミオグロビン（metMb）となり、その酸素結合能を失ってしまう。特に赤筋中には、H₂O₂を生成する代謝系が数多く存在するので、このH₂O₂によるMbO₂の酸化機構の解明は、単に生化学的な興味からばかりではなく、筋肉組織の虚血性疾患との関連においても極めて重要な意味を持つものである。

本研究では、まず筋肉組織からMbO₂を単離精製し、その溶液に種々の濃度のH₂O₂を加えて、その酸化速度と酸化当量関係を25℃、0.1 M緩衝液中で詳細に検討した。その結果H₂O₂はMbのoxy型よりもdeoxy型の方を100倍以上も早く酸化することが分った。従ってH₂O₂によるMbO₂の酸化反応は、MbO₂溶液中に存在するごく少量のdeoxy Mbの酸化を通じて進行することが明らかとなった。さらに、この反応を分光学的に追跡してみると、反応の中間過程には、ヘム鉄の原子価が4価の状態のferryl Mb (IV)が確認された。以上の結果をふまえ、H₂O₂はまずMbO₂溶液中のdeoxy Mb (II)に作用して二電子酸化を行い、これをferryl Mb (IV)とする。そしてこのferryl Mb (IV)は直ちにもう一分子のdeoxy Mb (II)を酸化して、最終的には2分子のmetMb (III)となるとする全く新しい反応機構を確立した。

以上、本論文は、本人が自立して研究活動を行うのに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、遊佐敬介提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。